



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 09 689.5

Anmeldetag: 28. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Neue für das metE-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen

Priorität: 02.08.2000 DE 100 38 023.9

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 05. Juli 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Nietiedt

Neue für das metE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das metE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das metE-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-amino-5-heprenoitsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph für

regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

- Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von
- 5 L-Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 10 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt,
- 15 sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das metE-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus

20 der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine
- 25 Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
5 Homocystein-Methyltransferase I aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid enthaltend die Nukleo-
20 tidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
25 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den
Vektor enthalten oder in denen das metE-Gen verstärkt
ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit
 5 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
 10 enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase I kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe
 15 Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Homocystein-Methyltransferase I-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen
 20 hergestellt werden kann, die für Homocystein-Methyltransferase I kodieren.

Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende
 25 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

30 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Homocystein-Methyltransferase I und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen die für das metE-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art

Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 5 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 15 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-Methionin produzierende Stamm

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

- 20 Das neue, für das Enzym Homocystein-Methyltransferase I (EC 2.1.1.14) kodierende *metE*-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

- Zur Isolierung des *metE*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.
- 25 Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
- 30 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.

Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen *metE* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins

abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des metE-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH

(Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des metE-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen

Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei
 Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991), bei
 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology
 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of
 5 Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung
 WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24
 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift
 JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and
 Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides
 10 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in
 bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße metE-Gen
 beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden
 überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in
 15 coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche
 bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al.,
 Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554),
 pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1
 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den
 20 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere
 Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4
 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS
 Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1
 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise
 25 verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe
 derer man das Verfahren der Genamplifikation durch
 Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es
 beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and
 30 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur
 Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons
 beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige
 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt
 (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum
 35 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise

pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem metE-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende tpi-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende pgk-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 5 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende pyc-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende lysC-Gen (Accession No.P26512),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen
10 metA (ACCESSION Number AF052652),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)
- 15 • das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende glyA-Gen (JP-A-08107788),
- das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende metY-Gen (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- 20 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des metE Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine - Kinase kodierende thrB-Gen
25 (ACCESSION Number P08210),
- das für die Threonin Dehydratase kodierende ilvA-Gen (ACCESSION Number Q04513),

- das für die Threonin Synthase kodierende thrC-Gen (ACCESSION Number P23669),
- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende ddh-Gen (ACCESSION Number Y00151),
- 5 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pck-Gen (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (DE: 10 1995 1975.7; DSM 13114).

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des metE-Gens unerwünschte Nebenreaktionen aususchalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können 20 kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über 25 bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen

von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- 5 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,
- 10 Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
- 15 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 20 Als Schwefelquelle, insbesondere für die Herstellung von Methionin können organische und anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide, Sulfite, Sulfate und Thiosulfate verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die
- 25 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe
 - 30 wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines

einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.
5 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem
10 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise
15 bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

20 Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten L-Methionin. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation
zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30%
25 der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die in dieser Weise hergestellte, insbesondere L-Methionin
30 haltige, Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt
35 oder vollständig in ihr belassen werden. Anschließend wird

diese mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert.

- 5 Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet werden.
- 10 Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen
- 15 organischen oder anorganischen Hilfsstoffen, beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futtermittelverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung
- 20 finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.

Unter „rieselfähig“ versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschiedenen großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

Wie hier beschrieben, ist mit „feinteilig“, ein Pulver mit überwiegendem Anteil ($> 50\%$) einer Korngröße von 20 bis 200 μm Durchmesser gemeint. Mit „grobkörnig“ sind Produkte mit überwiegendem Anteil ($> 50\%$) einer Korngröße von 200 bis 2000 μm Durchmesser gemeint. In diesem Sinne, bedeutet „staubfrei“, daß das Produkt lediglich geringe Anteile ($< 5\%$) an Korngrößen unter 20 μm Durchmesser enthält. Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der

35 Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die

entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

„Lagerbar“, im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das bis zu 120 Tagen, bevorzugt bis 52 Wochen, besonders bevorzugt 60 Monate gelagert werden kann ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Methionin auftritt.

Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

Wird die Biomasse während des Verfahrens abgetrennt, werden im allgemeinen weitere, zum Beispiel während der Fermentation zugesetzte anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße Tierfüttermitteladditiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten, insbesondere organische

Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.

In einem Aspekt der Erfindung kann die Biomasse bis zu 70%, bevorzugt bis zu 80%, bevorzugt bis zu 90%, bevorzugt bis zu 95%, und besonders bevorzugt bis zu 100% abgetrennt werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden bis zu 20% der Biomasse, bevorzugt bis zu 15%, bevorzugt bis zu 10%, bevorzugt bis zu 5%, besonders bevorzugt keine Biomasse abgetrennt.

- 10 Zu diesen organischen Stoffen gehören organische Nebenprodukte, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben dem L-Methionin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Dazu zählen L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-
- 15 Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan. Dazu zählen Vitamine ausgewählt aus der Gruppe Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothensäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), Nicotinsäure/Nicotinsäureamid und Vitamin
- 20 E (Tocopherol). Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls
- 25 erwünscht, wenn sie die nutritive Wertigkeit des Produktes verbessern.

Diese organischen Stoffe einschließlich des L-Methionins und/oder D-Methionins und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin können auch je nach Anforderung während eines

30 geeigneten Verfahrensschrittes als Konzentrat oder Reinsubstanz in fester oder flüssiger Form hinzugefügt werden. Diese genannten organischen Stoffe können einzeln oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder

35 Granulationsprozesses hinzugefügt werden. Es ist

- gleichfalls möglich einen organischen Stoff oder eine Mischung mehrerer organischen Stoffe zur Fermentationsbrühe und einen weiteren organischen Stoff oder eine weitere Mischung mehrerer organische Stoffe bei einem späteren
- 5 Verfahrensschritt, beispielsweise der Granulation, hinzuzufügen.

Das oben beschriebene Produkt ist als Futtermittelzusatz, d.h. Futtermittel-Additiv, für die Tierernährung geeignet.

- Der L-Methionin-Gehalt des Tierfuttermittel-Additivs
- 10 beträgt üblicherweise 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bevorzugt 2 Gew.-% bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 4 Gew.-% bis 80 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 8 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs. Gehalte von 1 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 60 Gew.-%,
- 15 4 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 6 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 1 Gew.-% bis 40 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 40 Gew.-% oder 4 Gew.-% bis 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich. Der Wassergehalt des Futtermittel-Additivs beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt
- 20 weniger als 2 Gew.-%.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

- 25 a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- 30 c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und

- d) Trocknung der gemäß a) und/oder b) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

Wenn erwünscht, können in dem erfindungsgemäßen Verfahren
5 weiterhin eine oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu
10 dem gemäß a), b) und/oder c) erhaltenen Produkten;
- f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach a) bis d) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- 15 g) Überführung der nach a) bis e) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin
20 Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

- 5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

- beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)

- 10 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
- 15 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

- Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
- 25 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
- 30

Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen
 5 in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
 10 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des metE-Gens

15 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-
 20 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im
 25 Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung
 30 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente

in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein

offenes Leseraster von 2235 Basenpaaren, welches als metE-Gen bezeichnet wurde. Das metE-Gen kodiert für ein Protein von 745 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das metE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000361 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2810

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (317)..(2551)

25 <223> metE Gen

<400> 1

agcccaaaac ggcaccatga atttaaatcc ccggaacttc ttgacagacc gagcagtcta 60

gggttttggtt gaaaacgcaa tcggttcact tttaatcctc tccctggagc cccggatgat 120

gaggaacgcc aaagctttct gaatggaaat tttaagcgtt aagtgggacg acctcgatta 180

caaaaaggcg aggaaacccc cggggcagct ttctgccacc cggtgatttc gcgaaccttg 240

aaacatcgtc agaagattgc cgtgcgtcct agccgggatc cgcacgttcg gctcaagcag 300

aaagtcttta actcac atg act tcc aac ttt tct tcc act gtc gct ggt ctt 352

Met Thr Ser Asn Phe Ser Ser Thr Val Ala Gly Leu

1 5 10

cct cgc atc gga gcg aag cgt gaa ctg aag ttc gcg ctc gaa ggc tac 400

Pro Arg Ile Gly Ala Lys Arg Glu Leu Lys Phe Ala Leu Glu Gly Tyr

15 20 25

tgg aat gga tca att gaa ggt cgc gaa ctt gcg cag acc gcc cgc caa 448

Trp Asn Gly Ser Ile Glu Gly Arg Glu Leu Ala Gln Thr Ala Arg Gln

30 35 40

ttg gtc aac act gca tcg gat tct ttg tct gga ttg gat tcc gtt ccg 496

Leu Val Asn Thr Ala Ser Asp Ser Leu Ser Gly Leu Asp Ser Val Pro

45 50 55 60

ttt gca gga cgt tcc tac tac gac gca atg ctc gat acc gcc gct att 544

Phe Ala Gly Arg Ser Tyr Tyr Asp Ala Met Leu Asp Thr Ala Ala Ile

55 65 70 75

ttg ggt gtg ctg ccg gag cgt ttt gat gac atc gct gat cat gaa aac 592

Leu Gly Val Leu Pro Glu Arg Phe Asp Asp Ile Ala Asp His Glu Asn

80 85 90

| | | |
|----|---|------|
| | gat ggt ctc cca ctg tgg att gac cgc tac ttt ggc gct gct cgc ggt | 640 |
| | Asp Gly Leu Pro Leu Trp Ile Asp Arg Tyr Phe Gly Ala Ala Arg Gly | |
| | 95 100 105 | |
| 5 | act gag acc ctg cct gca cag gca atg acc aag tgg ttt gat acc aac | 688 |
| | Thr Glu Thr Leu Pro Ala Gln Ala Met Thr Lys Trp Phe Asp Thr Asn | |
| | 110 115 120 | |
| 10 | tac cac tac ctc gtg ccg gag ttg tct gcg gat aca cgt ttc gtt ttg | 736 |
| | Tyr His Tyr Leu Val Pro Glu Leu Ser Ala Asp Thr Arg Phe Val Leu | |
| | 125 130 135 140 | |
| 15 | gat gcg tcc gcg ctg att gag gat ctc cgt tgc cag cag gtt cgt ggc | 784 |
| | Asp Ala Ser Ala Leu Ile Glu Asp Leu Arg Cys Gln Gln Val Arg Gly | |
| | 145 150 155 | |
| 20 | gtt aat gcc cgc cct gtt ctg gtt ggt cca ctg act ttc ctt tcc ctt | 832 |
| | Val Asn Ala Arg Pro Val Leu Val Gly Pro Leu Thr Phe Leu Ser Leu | |
| | 160 165 170 | |
| 25 | gct cgc acc act gat ggt tcc aat cct ttg gat cac ctg cct gca ctg | 880 |
| | Ala Arg Thr Thr Asp Gly Ser Asn Pro Leu Asp His Leu Pro Ala Leu | |
| | 175 180 185 | |
| 30 | ttt gag gtc tac gag cgc ctc atc aag tct ttc gat act gag tgg gtt | 928 |
| | Phe Glu Val Tyr Glu Arg Leu Ile Lys Ser Phe Asp Thr Glu Trp Val | |
| | 190 195 200 | |
| 35 | cag atc gat gag cct gcg ttg gtc acc gat gtt gct cct gag gtt ttg | 976 |
| | Gln Ile Asp Glu Pro Ala Leu Val Thr Asp Val Ala Pro Glu Val Leu | |
| | 205 210 215 220 | |
| 40 | gag cag gtc cgc gct ggt tac acc act ttg gct aag cgc gat ggc gtg | 1024 |
| | Glu Gln Val Arg Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Ala Lys Arg Asp Gly Val | |
| | 225 230 235 | |
| 45 | ttt gtc aat act tac ttc ggc tct ggc gat cag gcg ctg aac act ctt | 1072 |
| | Phe Val Asn Thr Tyr Phe Gly Ser Gly Asp Gln Ala Leu Asn Thr Leu | |
| | 240 245 250 | |
| 50 | gcg ggc atc ggc ctt ggc gcg att ggc gtt gac ttg gtc acc cat ggc | 1120 |
| | Ala Gly Ile Gly Leu Gly Ala Ile Gly Val Asp Leu Val Thr His Gly | |
| | 255 260 265 | |
| 55 | gtc act gag ctt gct gcg tgg aag ggt gag gag ctg ctg gtt gcg ggc | 1168 |
| | Val Thr Glu Leu Ala Ala Trp Lys Gly Glu Glu Leu Leu Val Ala Gly | |
| | 270 275 280 | |
| 60 | atc gtt gat ggt cgt aac att tgg cgc acc gac ctg tgt gct gct ctt | 1216 |
| | Ile Val Asp Gly Arg Asn Ile Trp Arg Thr Asp Leu Cys Ala Ala Leu | |
| | 285 290 295 300 | |
| 65 | gct tcc ctg aag cgc ctg gca gct cgc ggc cca atc gca gtg tct acc | 1264 |
| | Ala Ser Leu Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Pro Ile Ala Val Ser Thr | |
| | 305 310 315 | |

| | | |
|----|---|------|
| | tct tgt tca ctg ctg cac gtt cct tac acc ctc gag gct gag aac att | 1312 |
| | Ser Cys Ser Leu Leu His Val Pro Tyr Thr Leu Glu Ala Glu Asn Ile | |
| | 320 325 330 | |
| 5 | gag cct gag gtc cgc gac tgg ctt gcc ttc ggc tcg gag aag atc acc | 1360 |
| | Glu Pro Glu Val Arg Asp Trp Leu Ala Phe Gly Ser Glu Lys Ile Thr | |
| | 335 340 345 | |
| 10 | gag gtc aag ctg ctt gcc gac gcc cta gcc ggc aac atc gac gcg gct | 1408 |
| | Glu Val Lys Leu Leu Ala Asp Ala Leu Ala Gly Asn Ile Asp Ala Ala | |
| | 350 355 360 | |
| 15 | gcg ttc gat gcg gcg tcc gca gca att gct tct cga cgc acc tcc cca | 1456 |
| | Ala Phe Asp Ala Ala Ser Ala Ala Ile Ala Ser Arg Arg Thr Ser Pro | |
| | 365 370 375 380 | |
| 20 | cgc acc gca cca atc acg cag gaa ctc cct ggc cgt agc cgt gga tcc | 1504 |
| | Arg Thr Ala Pro Ile Thr Gln Glu Leu Pro Gly Arg Ser Arg Gly Ser | |
| | 385 390 395 | |
| 25 | ttc gac act cgt gtt acg ctg cag gag aag tca ctg gag ctt cca gct | 1552 |
| | Phe Asp Thr Arg Val Thr Leu Gln Glu Lys Ser Leu Glu Leu Pro Ala | |
| | 400 405 410 | |
| 30 | ctg cca acc acc acc att ggt tct ttc cca cag acc cca tcc att cgt | 1600 |
| | Leu Pro Thr Thr Thr Ile Gly Ser Phe Pro Gln Thr Pro Ser Ile Arg | |
| | 415 420 425 | |
| 35 | tct gct cgc gct cgt ctg cgc aag gaa tcc atc act ttg gag cag tac | 1648 |
| | Ser Ala Arg Ala Arg Leu Arg Lys Glu Ser Ile Thr Leu Glu Gln Tyr | |
| | 430 435 440 | |
| 40 | gaa gag gca atg cgc gaa gaa atc gat ctg gtc atc gcc aag cag gaa | 1696 |
| | Glu Glu Ala Met Arg Glu Glu Ile Asp Leu Val Ile Ala Lys Gln Glu | |
| | 445 450 455 460 | |
| 45 | gaa ctt ggt ctt gat gtg ttg gtt cac ggt gag cca gag cgc aac gac | 1744 |
| | Glu Leu Gly Leu Asp Val Leu Val His Gly Glu Pro Glu Arg Asn Asp | |
| | 465 470 475 | |
| 50 | atg gtt cag tac ttc tct gaa ctt ctc gac ggt ttc ctc tca acc gcc | 1792 |
| | Met Val Gln Tyr Phe Ser Glu Leu Leu Asp Gly Phe Leu Ser Thr Ala | |
| | 480 485 490 | |
| 55 | aac ggc tgg gtc caa agc tac ggc tcc cgc tgt gtt cgt cct cca gtg | 1840 |
| | Asn Gly Trp Val Gln Ser Tyr Gly Ser Arg Cys Val Arg Pro Pro Val | |
| | 495 500 505 | |
| 60 | ttg ttc gga aac gtt tcc cgc cca gcg cca atg act gtc aag tgg ttc | 1888 |
| | Leu Phe Gly Asn Val Ser Arg Pro Ala Pro Met Thr Val Lys Trp Phe | |
| | 510 515 520 | |
| 65 | cag tac gca cag agc ctg acc cag aag cat gtc aag gga atg ctc acc | 1936 |
| | Gln Tyr Ala Gln Ser Leu Thr Gln Lys His Val Lys Gly Met Leu Thr | |
| | 525 530 535 540 | |
| 70 | ggt cca gtc acc atc ctt gca tgg tcc ttc gtt cgc gat gat cag ccg | 1984 |
| | Gly Pro Val Thr Ile Leu Ala Trp Ser Phe Val Arg Asp Asp Gln Pro | |
| | 545 550 555 | |

| | | |
|----|---|------|
| 5 | ctg gct acc act gct gac cag gtt gca ctg gca ctg cgc gat gaa att | 2032 |
| | Leu Ala Thr Thr Ala Asp Gln Val Ala Leu Ala Leu Arg Asp Glu Ile | |
| | 560 565 570 | |
| 10 | aac gat ctc atc gag gct ggc gcg aag atc atc cag gtg gat gag cct | 2080 |
| | Asn Asp Leu Ile Glu Ala Gly Ala Lys Ile Ile Gln Val Asp Glu Pro | |
| | 575 580 585 | |
| 15 | gcg att cgt gaa ctg ttg ccg cta cga gac gtc gat aag cct gcc tac | 2128 |
| | Ala Ile Arg Glu Leu Leu Pro Leu Arg Asp Val Asp Lys Pro Ala Tyr | |
| | 590 595 600 | |
| 20 | ctg cag tgg tcc gtg gac tcc ttc cgc ctg gcg act gcc ggc gca ccc | 2176 |
| | Leu Gln Trp Ser Val Asp Ser Phe Arg Leu Ala Thr Ala Gly Ala Pro | |
| | 605 610 615 620 | |
| 25 | gac gac gtc caa atc cac acc cac atg tgc tac tcc gag ttc aac gaa | 2224 |
| | Asp Asp Val Gln Ile His Thr His Met Cys Tyr Ser Glu Phe Asn Glu | |
| | 625 630 635 | |
| 30 | gtg atc tcc tcg gtc atc gcg ttg gat gcc gat gtc acc acc atc gaa | 2272 |
| | Val Ile Ser Ser Val Ile Ala Leu Asp Ala Asp Val Thr Thr Ile Glu | |
| | 640 645 650 | |
| 35 | gca gca cgt tcc gac atg cag gtc ctc gct gct ctg aaa tct tcc ggc | 2320 |
| | Ala Ala Arg Ser Asp Met Gln Val Leu Ala Ala Leu Lys Ser Ser Gly | |
| | 655 660 665 | |
| 40 | ttc gag ctc ggc gtc gga cct ggt gtg tgg gat atc cac tcc ccg cgc | 2368 |
| | Phe Glu Leu Gly Val Gly Pro Gly Val Trp Asp Ile His Ser Pro Arg | |
| | 670 675 680 | |
| 45 | gtt cct tcc gcg cag gaa gtg gac ggt ctc ctc gag gct gca ctg cag | 2416 |
| | Val Pro Ser Ala Gln Glu Val Asp Gly Leu Leu Glu Ala Ala Leu Gln | |
| | 685 690 695 700 | |
| 50 | tcc gtg gat cct cgc cag ctg tgg gtc aac cca gac tgt ggt ctg aag | 2464 |
| | Ser Val Asp Pro Arg Gln Leu Trp Val Asn Pro Asp Cys Gly Leu Lys | |
| | 705 710 715 | |
| 55 | acc cgt gga tgg cca gaa gtg gaa gct tcc cta aag gtt ctc gtt gag | 2512 |
| | Thr Arg Gly Trp Pro Glu Val Glu Ala Ser Leu Lys Val Leu Val Glu | |
| | 720 725 730 | |
| 60 | tcc gct aag cag gct cgt gag aaa atc gga gca act atc taaattgggt | 2561 |
| | Ser Ala Lys Gln Ala Arg Glu Lys Ile Gly Ala Thr Ile | |
| | 735 740 745 | |
| 65 | taccgctagg aacccaaaga ttaagggcac gagtgtcacc aggattgccg cacccatggc | 2621 |
| | aacaccgaag gacaccgtgc ccactcctat ttgcatcaca gcgccaagg tagcggcgcc | 2681 |
| 70 | caaaacagcg cccacctggc gtgaggtgtt gtaaaaacca gaagcagagc ccactaaatc | 2741 |
| | ctgcggaaca tcacgcagag caatcacaga gttcggtgca aaactcatcg cggttgagct | 2801 |
| | accgaacaa | 2810 |

<210> 2
 <211> 745
 5 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

 <400> 2
 10 Met Thr Ser Asn Phe Ser Ser Thr Val Ala Gly Leu Pro Arg Ile Gly
 1 5 10 15
 Ala Lys Arg Glu Leu Lys Phe Ala Leu Glu Gly Tyr Trp Asn Gly Ser
 20 25 30
 15 Ile Glu Gly Arg Glu Leu Ala Gln Thr Ala Arg Gln Leu Val Asn Thr
 35 40 45
 Ala Ser Asp Ser Leu Ser Gly Leu Asp Ser Val Pro Phe Ala Gly Arg
 50 55 60
 20 Ser Tyr Tyr Asp Ala Met Leu Asp Thr Ala Ala Ile Leu Gly Val Leu
 65 70 75 80
 25 Pro Glu Arg Phe Asp Asp Ile Ala Asp His Glu Asn Asp Gly Leu Pro
 85 90 95
 Leu Trp Ile Asp Arg Tyr Phe Gly Ala Ala Arg Gly Thr Glu Thr Leu
 100 105 110
 30 Pro Ala Gln Ala Met Thr Lys Trp Phe Asp Thr Asn Tyr His Tyr Leu
 115 120 125
 Val Pro Glu Leu Ser Ala Asp Thr Arg Phe Val Leu Asp Ala Ser Ala
 130 135 140
 35 Leu Ile Glu Asp Leu Arg Cys Gln Gln Val Arg Gly Val Asn Ala Arg
 145 150 155 160
 40 Pro Val Leu Val Gly Pro Leu Thr Phe Leu Ser Leu Ala Arg Thr Thr
 165 170 175
 Asp Gly Ser Asn Pro Leu Asp His Leu Pro Ala Leu Phe Glu Val Tyr
 180 185 190
 45 Glu Arg Leu Ile Lys Ser Phe Asp Thr Glu Trp Val Gln Ile Asp Glu
 195 200 205
 Pro Ala Leu Val Thr Asp Val Ala Pro Glu Val Leu Glu Gln Val Arg
 210 215 220
 50 Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Ala Lys Arg Asp Gly Val Phe Val Asn Thr
 225 230 235 240
 Tyr Phe Gly Ser Gly Asp Gln Ala Leu Asn Thr Leu Ala Gly Ile Gly
 245 250 255
 55 Leu Gly Ala Ile Gly Val Asp Leu Val Thr His Gly Val Thr Glu Leu
 260 265 270

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Ala | Ala | Trp | Lys | Gly | Glu | Glu | Leu | Leu | Val | Ala | Gly | Ile | Val | Asp | Gly | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| 5 | Arg | Asn | Ile | Trp | Arg | Thr | Asp | Leu | Cys | Ala | Ala | Leu | Ala | Ser | Leu | Lys | |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| | Arg | Leu | Ala | Ala | Arg | Gly | Pro | Ile | Ala | Val | Ser | Thr | Ser | Cys | Ser | Leu | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| 10 | Leu | His | Val | Pro | Tyr | Thr | Leu | Glu | Ala | Glu | Asn | Ile | Glu | Pro | Glu | Val | |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| | Arg | Asp | Trp | Leu | Ala | Phe | Gly | Ser | Glu | Lys | Ile | Thr | Glu | Val | Lys | Leu | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| 15 | Leu | Ala | Asp | Ala | Leu | Ala | Gly | Asn | Ile | Asp | Ala | Ala | Ala | Phe | Asp | Ala | |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| 20 | Ala | Ser | Ala | Ala | Ile | Ala | Ser | Arg | Arg | Thr | Ser | Pro | Arg | Thr | Ala | Pro | |
| | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| | Ile | Thr | Gln | Glu | Leu | Pro | Gly | Arg | Ser | Arg | Gly | Ser | Phe | Asp | Thr | Arg | |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| 25 | Val | Thr | Leu | Gln | Glu | Lys | Ser | Leu | Glu | Leu | Pro | Ala | Leu | Pro | Thr | Thr | |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| | Thr | Ile | Gly | Ser | Phe | Pro | Gln | Thr | Pro | Ser | Ile | Arg | Ser | Ala | Arg | Ala | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| 30 | Arg | Leu | Arg | Lys | Glu | Ser | Ile | Thr | Leu | Glu | Gln | Tyr | Glu | Glu | Ala | Met | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | | 445 | | | | |
| | Arg | Glu | Glu | Ile | Asp | Leu | Val | Ile | Ala | Lys | Gln | Glu | Glu | Leu | Gly | Leu | |
| 35 | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| | Asp | Val | Leu | Val | His | Gly | Glu | Pro | Glu | Arg | Asn | Asp | Met | Val | Gln | Tyr | |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | |
| 40 | Phe | Ser | Glu | Leu | Leu | Asp | Gly | Phe | Leu | Ser | Thr | Ala | Asn | Gly | Trp | Val | |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | |
| | Gln | Ser | Tyr | Gly | Ser | Arg | Cys | Val | Arg | Pro | Pro | Val | Leu | Phe | Gly | Asn | |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| 45 | Val | Ser | Arg | Pro | Ala | Pro | Met | Thr | Val | Lys | Trp | Phe | Gln | Tyr | Ala | Gln | |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | |
| | Ser | Leu | Thr | Gln | Lys | His | Val | Lys | Gly | Met | Leu | Thr | Gly | Pro | Val | Thr | |
| 50 | | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | |
| | Ile | Leu | Ala | Trp | Ser | Phe | Val | Arg | Asp | Asp | Gln | Pro | Leu | Ala | Thr | Thr | |
| | 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | |
| 55 | Ala | Asp | Gln | Val | Ala | Leu | Ala | Leu | Arg | Asp | Glu | Ile | Asn | Asp | Leu | Ile | |
| | | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | |
| | Glu | Ala | Gly | Ala | Lys | Ile | Ile | Gln | Val | Asp | Glu | Pro | Ala | Ile | Arg | Glu | |
| | | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | |

Leu Leu Pro Leu Arg Asp Val Asp Lys Pro Ala Tyr Leu Gln Trp Ser
 595 600 605
 5 Val Asp Ser Phe Arg Leu Ala Thr Ala Gly Ala Pro Asp Asp Val Gln
 610 615 620
 10 Ile His Thr His Met Cys Tyr Ser Glu Phe Asn Glu Val Ile Ser Ser
 625 630 635 640
 Val Ile Ala Leu Asp Ala Asp Val Thr Thr Ile Glu Ala Ala Arg Ser
 645 650 655
 15 Asp Met Gln Val Leu Ala Ala Leu Lys Ser Ser Gly Phe Glu Leu Gly
 660 665 670
 Val Gly Pro Gly Val Trp Asp Ile His Ser Pro Arg Val Pro Ser Ala
 675 680 685
 20 Gln Glu Val Asp Gly Leu Leu Glu Ala Ala Leu Gln Ser Val Asp Pro
 690 695 700
 25 Arg Gln Leu Trp Val Asn Pro Asp Cys Gly Leu Lys Thr Arg Gly Trp
 705 710 715 720
 Pro Glu Val Glu Ala Ser Leu Lys Val Leu Val Glu Ser Ala Lys Gln
 725 730 735
 30 Ala Arg Glu Lys Ile Gly Ala Thr Ile
 740 745

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
- 20 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
- 25 5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
 - (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
 7. Coryneforme Bakterien, in denen das metE-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
 8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
 9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das metE-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des

Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das metE-Gen kodierende
Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das metE-Gen
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
überexprimiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für
das das Polynukleotid metE kodiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe

 - 15.1 das für eine feed back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
 - 30 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
- 15.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 5 15.5 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi
- 15.6 das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA
- 10 15.7 das für die Cystahionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB
- 15.8 das für die Cystahionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD
- 15.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA
- 15 15.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY

verstärkt bzw. überexprimiert.

- 16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
20 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 25 16.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB
- 16.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA

- 16.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC
- 16.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh
- 5 16.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck
- 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase kodierende Gen pgi
- 10 16.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- abschwächt.
17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 15
18. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte
- 20 a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- 25 c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.
- 30

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges von L-Methionin verstärkt.
- 5 20. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung L-Methionin verringern.
- 10 21. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression der Polynukleotide, die für das metE-Gen kodieren verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 15 22. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 20 23. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass man zusätzlich noch einen oder mehrere folgender Schritte durchführt:
 - e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß b), c) und/oder d) erhaltenen Produkten;
 - 25 f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach b) bis e) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
 - 30 g) Überführung der nach b) bis f) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile

Form durch Beschichtung („Coating“) mit
Filmbildnern.

24. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch
gekennzeichnet dass ein Teil der Biomasse entfernt
wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet
dass bis zu 100% der Biomasse entfernt wird.
26. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch
gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei bis zu
5 Gew.-% liegt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet
dass der Wassergehalt bei weniger als 2 Gew.-% liegt.
28. Verfahren gemäß Anspruch 23, 24, 25, 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet dass die Filmbildner
Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat,
Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether sind.
29. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß Ansprüchen
18 bis 28.
30. Tierfuttelmittel-Additiv gemäß Anspruch 29, dadurch
gekennzeichnet dass es 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%
L_Methionin, D-Methionin, D,L-Methionin oder einer
Mischung davon, bezogen auf die Trockenmasse des
Tierfuttermittel-Additivs, enthält.
31. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase I
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
Homocystein-Methyltransferase I Gens aufweisen,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2,
3 oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metE-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.